

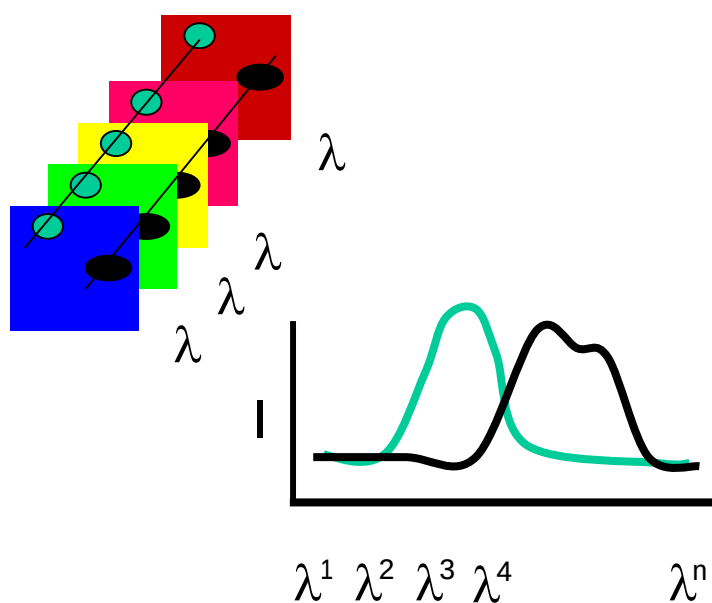
共焦点レーザースキャン顕微鏡

LSM710/780

ZEN2012

Emission Fingerprinting

簡易取扱説明書



2013.10

Carl Zeiss Microscopy Co.,Ltd.

ZEN2012 は、カールツァイス社製共焦点レーザスキャン顕微鏡専用の制御ソフトウェアです。ZEN では、各種モードによる画像取得から、様々な画像処理、データ解析が可能です。

本冊子では、試料の蛍光スペクトル情報を取得する「Lambda mode」機能についてご説明しております。ソフトウェアのより詳細な操作に関しては英文マニュアルをご参照ください。

機器を有効にお使いいただくために、トレーナーによる取扱い説明を必ず受けるようにしてください。不明な点がございましたら弊社担当までご連絡下さい。

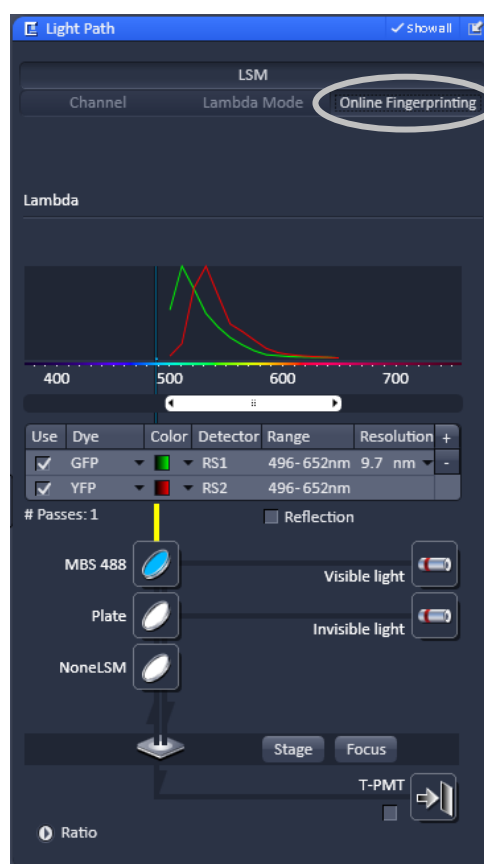
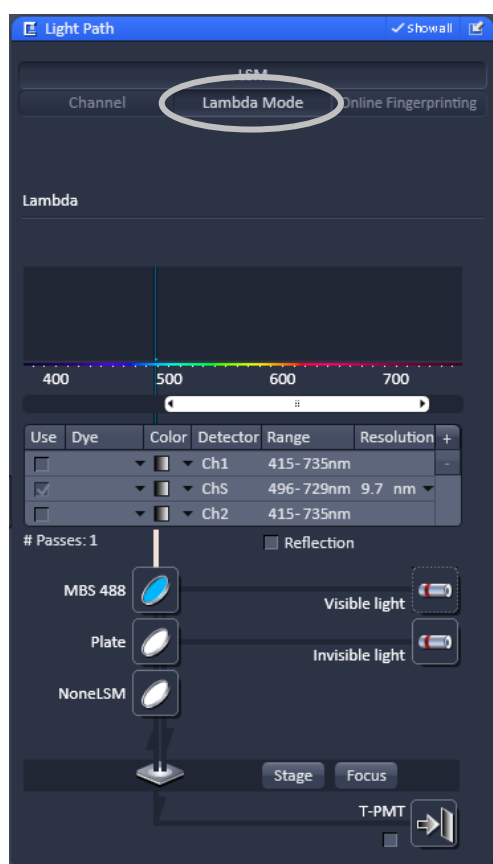
Lambda mode を使用した画像の取得	2
1. Lambda mode 測定の手順	4
1-1. 光路の設定	5
1-2. 画質の調整	7
1-3. 画像の取得	8
1-4. スペクトルの測定	9
1-5. Linear Unmixing (スペクトル情報による蛍光の分離)	10
1-5-1. 多重染色の染め分け部分が特定できる場合	10
1-5-2. 多重染色の染め分け部分が特定しにくい場合	11
2. Online Fingerprinting	13
2-1. 光路の設定	13
2-2. 画質の調整、画像の取得	14
3. その他の機能	15
3-1. ACE (Automatic Component Extraction)	15
3-2. Extract	16
3-3. Apply to hardware	16

Lambda Mode を使用した画像の取得

LSM710/780は、試料からの蛍光シグナルを回折格子で分光し、各波長帯をそれぞれに検出する光学系になっています。各波長帯のシグナルを検出することにより、各画素が波長情報をもつλスタックを取得することができます。λスタックからは、試料の蛍光スペクトルグラフを取得することができ(**Emission Fingerprinting**)、また、取得したスペクトルの形状から、複数の蛍光色素を分離することが可能です(**Linear Unmixing**)。 **Linear Unmixing**処理を行うには、下記2種類の方法があります。

【Lambda Mode】: λスタックの画像を取得するモードです。選択した検出器の数の分だけ画像を取得します。スペクトルの経時変化を取得する場合などにも利用します。 **Linear Unmixing** (波長の分離)を行う際に、リファレンスのスペクトル情報が無い場合は必ずこちらから行います。

【Online Fingerprinting】: すでに取得してあるレファレンスのスペクトル情報を用いて、**Online** で **Linear Unmixing**を行うモードです。この場合にはλスタックの画像取得は行われず、ダイレクトに分離後の画像が表示されます。



1. Lambda Mode

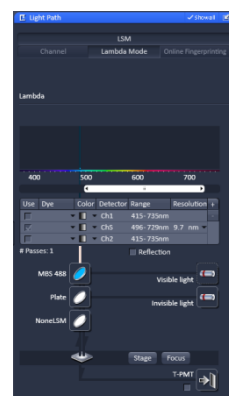
λ スタック画像を取得するモードです。選択した検出器の数の分だけ画像を取得します。スペクトルの経時変化を取得する場合などにも利用します。**Linear Unmixing**(波長の分離)を行う際に、リファレンスのスペクトル情報が無い場合は必ずこちらから行います。

測定の手順

Emission Fingerprinting の基本的な流れは以下のとおりです。

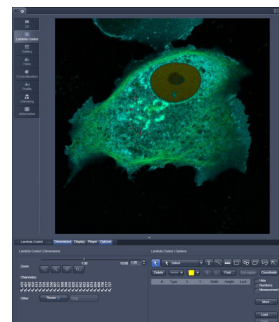
1-1. 光路の設定

・画像取得時のメインビームスプリッター、レーザの波長と強度、取得する波長範囲の選択をします。



1-2. 画質の調整(コントラスト・ブライトネスの調整)

・画像にサチュレーションした部分が含まれると Linear Unmixing の際に良好な結果が得られません。ここではサチュレーションしないよう、コントラスト・ブライトネスの調整を行います。

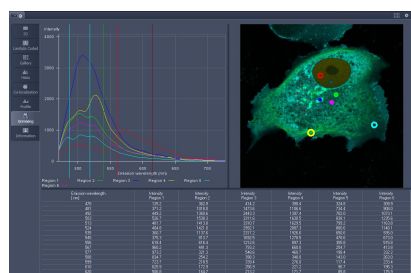


1-3. 画像の取得

・目的に応じて、XY、Z スタック、Time Series などの画像取得を行います。

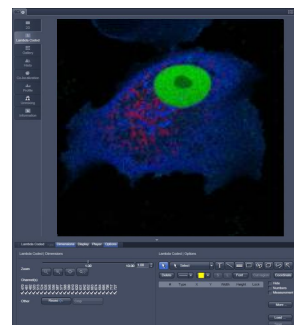
1-4. スペクトルの測定

・得られた画像からスペクトルの測定を行います。必要であればそのスペクトル情報を登録します。



1-5. Linear Unmixing

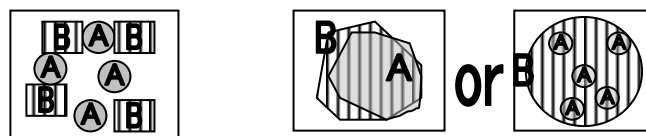
・スペクトル情報をもとに Unmix 処理を行い、色素ごとに分離した画像を作成します。



サンプルの状態には大別して 2 種類のケースがあります。

Case 1: 多重蛍光が染め分けされている部分が特定できるもの

Case 2: 多重蛍光の染め分け部分が特定しにくいもの



Case 1 の場合、3 ページの手順どおりとなります。

Case 2 の場合、その組織・細胞からの単独の色素のスペクトル情報(リファレンススペクトル)を事前に取得しておく必要があります。(重なったスペクトルをもとに Unmix 処理を行った場合、正確な分離結果を得ることはできません。)

例えば、A と B の色素を用いている場合には

- (A) だけを染色/発現させたサンプル(A)
- (B) だけを染色/発現させたサンプル(B)
- (AB) を染色/発現させたサンプル (AB)

をご用意いただく必要があります。

その上で

サンプル(A)のスペクトル情報を取得



サンプル(B)のスペクトル情報を取得



上記(A),(B)のスペクトル情報を元に、サンプル(AB)の画像から Unmix 処理を行う

という手順になります。

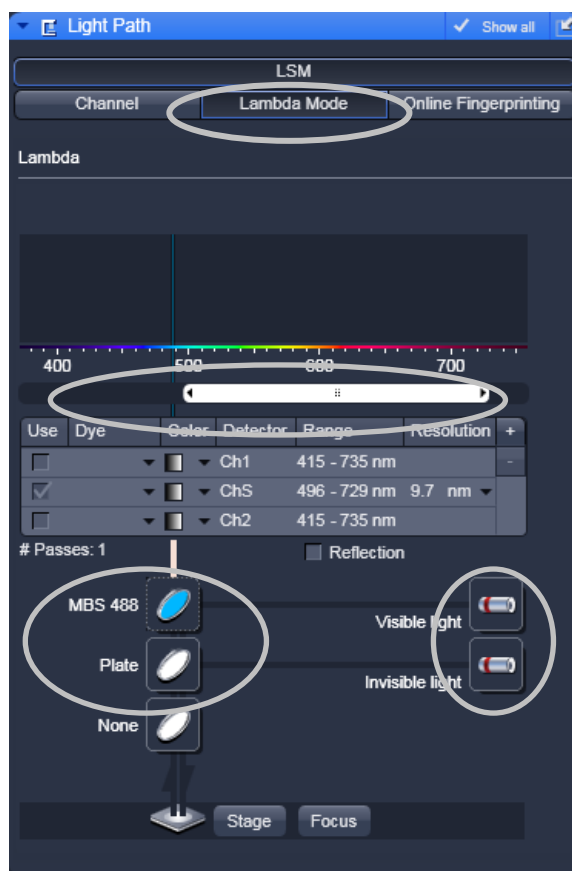
注意) スペクトル情報に関しては、同じ色素であっても、別の組織/細胞に染色/発現された場合には、環境により若干異なる波形を示すことがありますので、たとえ同じ色素を用いる場合でも別の組織/細胞で実験を行う場合にはその都度スペクトルを測定し、波長情報を得ることをお勧めします。

1-1. 光路の設定

Light Path ツールより **Lambda Mode** を選択します。

Light Path ツールより、光路設定を行います。

- ① **Laser**: 励起レーザの波長の選択と強度の調整を行います。
- ② **MBS**: 使用するレーザに合ったビームスプリッタを選択します。
- ③ **検出波長範囲**: 蛍光色素に応じた検出波長範囲を選択します。



例として、GFPを発現した細胞を画像取得する場合の光路設定のしかたについて説明します。

① 使用するLaserの設定

Light Path ツール内の **Lasers** のアイコンをクリックし、使用する波長のレーザにチェックを入れ、レーザパワー(%)を設定します。(波長により、Visible Light(可視域レーザ)とInvisible Light(405nm, NLOレーザ用)の2つに光路が分かれています。)

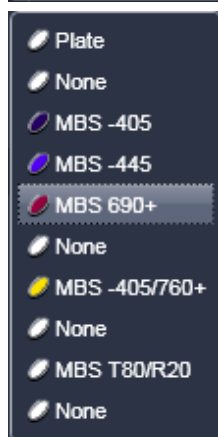
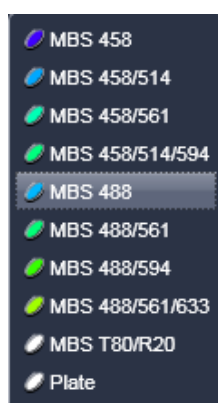


※ 左図ではVisible Lightから488nmのレーザを選択し、レーザパワーを2%に設定しています。

② メインビームスプリッタ(MBS)の設定

MBSのアイコンをクリックし、①で選択したレーザ波長に対応したビームスプリッタを選択します。

Visibleレーザ用とInvisibleレーザ用の2つの光路があります。

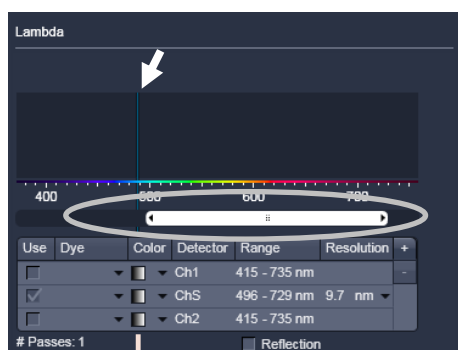


注) 搭載しているレーザによって選択できるビームスプリッタの種類は異なります。

※ GFPの画像を取得する場合は、ここでは488nmのレーザを効率よくサンプルに照射するために、**MBS 488**を選択します。

③ 検出波長範囲の設定

下図のスライダーにより検出波長範囲を選択します。①で選択された励起波長がラインで表示さ



れますので、励起波長よりも長波長側から範囲を設定してください。励起波長を含んで検出波長範囲を選択すると、励起光の反射が画像に入る可能性がありますのでご注意ください。

※ 左図では、496 nm - 729nmの波長範囲 225nm分を LSM710は9.7 nm、LSM780は8.7nmの間隔で取得するように設定しています。

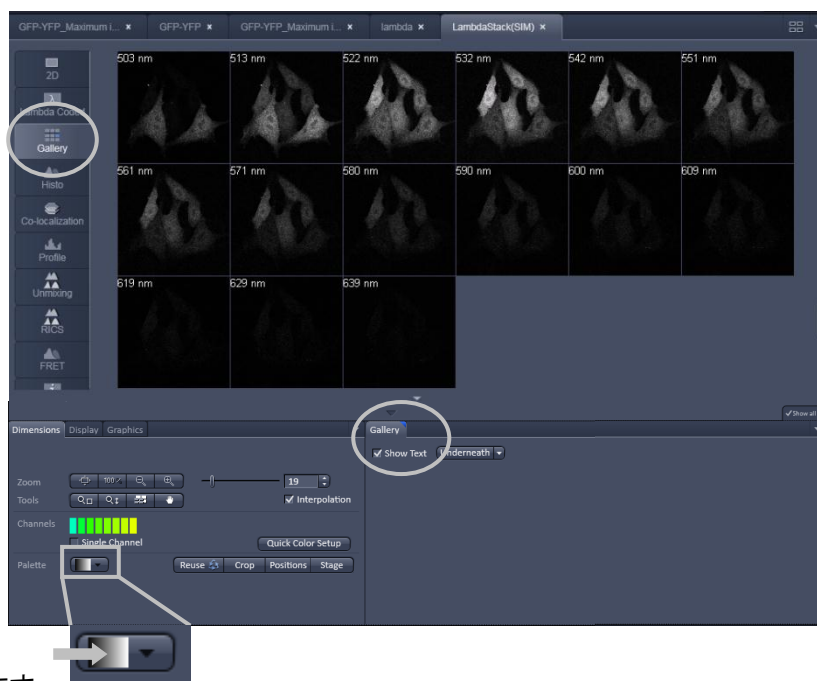
1-2. 画質の調整

ここでは画像がサチュレーションしないようにコントラスト&ブライトネスの調整を行います。操作は通常の画像取りと同じ手順になりますが、後にLinear Unmix処理を行う場合、サチュレーションした情報が含まれると正しく分離が行われません。なるべく設定された階調の中に情報が含まれるように調整してください。

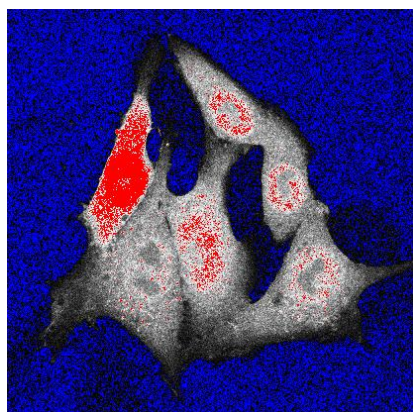
・スキャンをすると、はじめに2D表示で画像が表示されますので、画像ウインドウ左の**Gallery**タブをクリックします。

λスタックのデータがギャラリー表示に切り替わり、各波長帯の画像を確認することができます。

・画像ウインドウ下の**Dimensions - Palette**から擬似カラーを**Range indicator**表示に切り替えます。



・サチュレーション部分を確認しながら調整を行います。



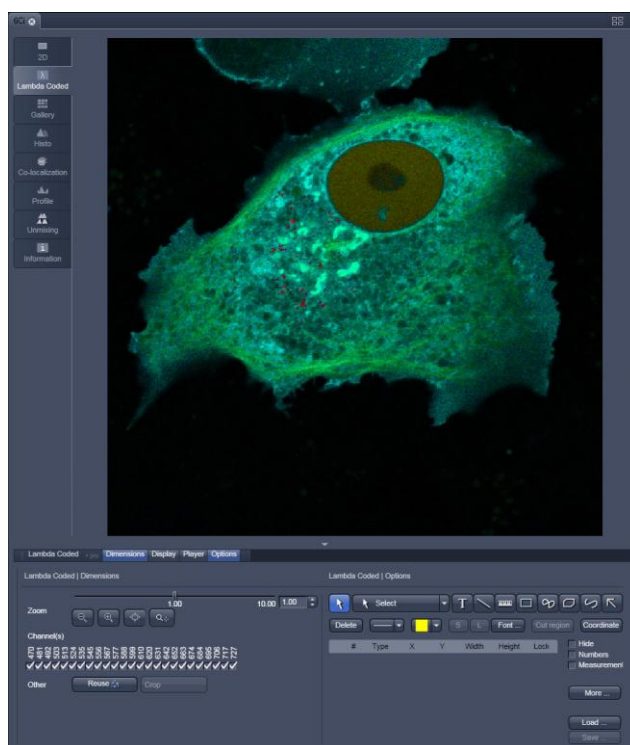
1-3. 画像の取得

・コントラスト&ブライトネスの調節ができましたら、**Snap**で最終的な画像を取得します。通常の画像取りと同じように、アベレージング(加算平均)を加えることも可能です。

また、**Zスタック**や**Time Series**などを行う場合は、それらの設定を行い、**Start Experiment**にて画像取得を行ってください。

- ・ 2 D (X-Y)
- ・ 3 D (XYZ)
- ・ Time Series (XY-T)
- ・ 4 D (XYZ-T) 等

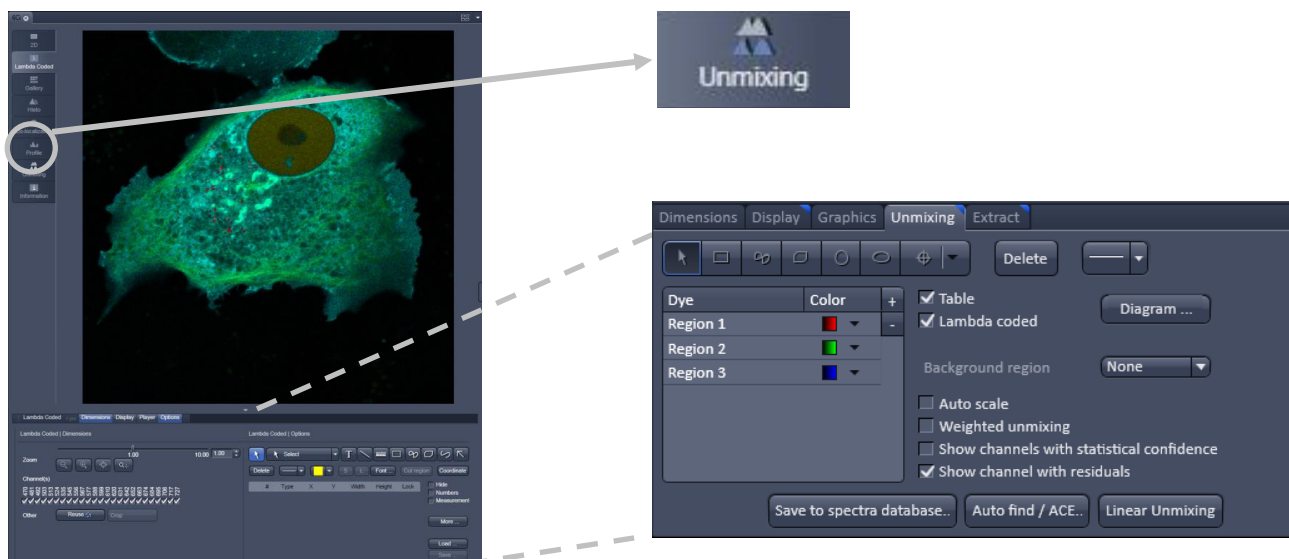
注意) 最終的な画像を取得する際には、メモリの負担軽減のためモニタ上にあまり画像を表示しておかないようにしてください。
λスタック画像は、**Time Series** などの場合、非常にファイルサイズが大きくなる可能性があります(選択した波長範囲、枚数に依存します)。その分メモリを占有してしまいますので、PCの動きが遅くなる場合があります。



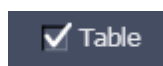
※ あらかじめ色素のリファレンスデータを取得している場合には、Online Fingerprinting を用いる事で、メモリの負担を軽減させながら画像取得していく事も可能です。

1-4. スペクトルの測定

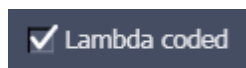
画像ウインドウ左側の **Unmixing** タブを選択すると、画像ウインドウ下部に **Unmixing** コントローラ(スペクトル測定ツール)が表示されます。



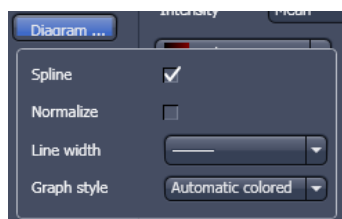
・各種表示方法を選択及び、描画ツールを使用し、画像上の任意の領域を選択します。



： 測定結果の数値をテーブル表示します。テーブル上でマウス右クリックするとText形式で保存することができます。



： 取得したラムダスタック画像に擬似カラーを載せて表示します。



： グラフの表現方法を設定します。
グラフ上の曲線をSplineまたはNormalizeした状態で表示することができます。



： 取得したスペクトル情報をデータベースに保存します。



： 画像に含まれる色素の数を入力すると、画像中から自動的にスペクトルカーブを検索します (15ページ「その他の機能」参照)。

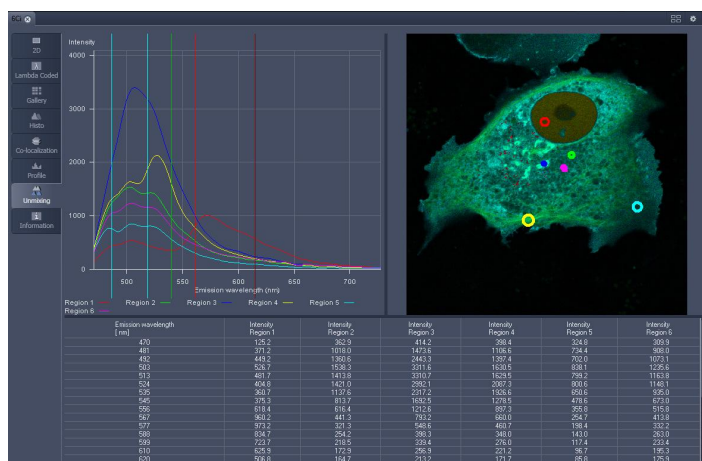


： 選択したスペクトル情報を元にUnmixing処理を行います。

1-5. Linear Unmixing (スペクトル情報による蛍光色素の分離)

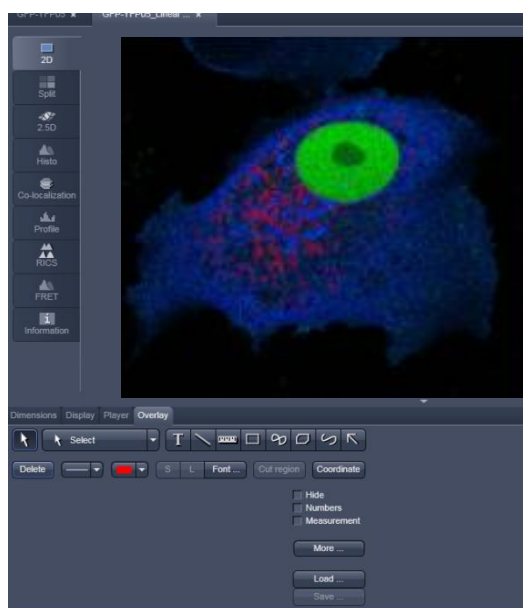
1-5-1. 多重染色の染め分けされている部分が特定できる場合 (Case 1)

前頁の描画ツールにより任意の領域を選択すると、自動的に測定結果のスペクトルカーブが画像の左側に表示されます。それぞれの蛍光色素で染色されている部分を選択し、各々の色素のスペクトルを表示させます。



測定ツール内にある **Linear Unmixing** ボタンをクリックします。

Linear Unmixing処理を行い、スペクトル情報から分離を行った結果を新規画像として作成します。結果の画像は、選択したスペクトル情報の数に応じて、それぞれをチャンネルとして表示します。



Auto Scale

: 各チャンネルの輝度を自動的に同レベルに補正します。

Weighted unmixing

: ノイズ成分の分析も含め、Unmixingを行います。(精度は高いですが、計算に時間がかかります)

Show channels with statistical confidence

: 相対標準偏差を示すチャンネルを、チャンネル毎に表示することで、データの信ぴょう性を図ることができます。

Show channel with residuals

: Unmixing で残余したデータを表示します。少ないほど、分離が成功していると判断できます。

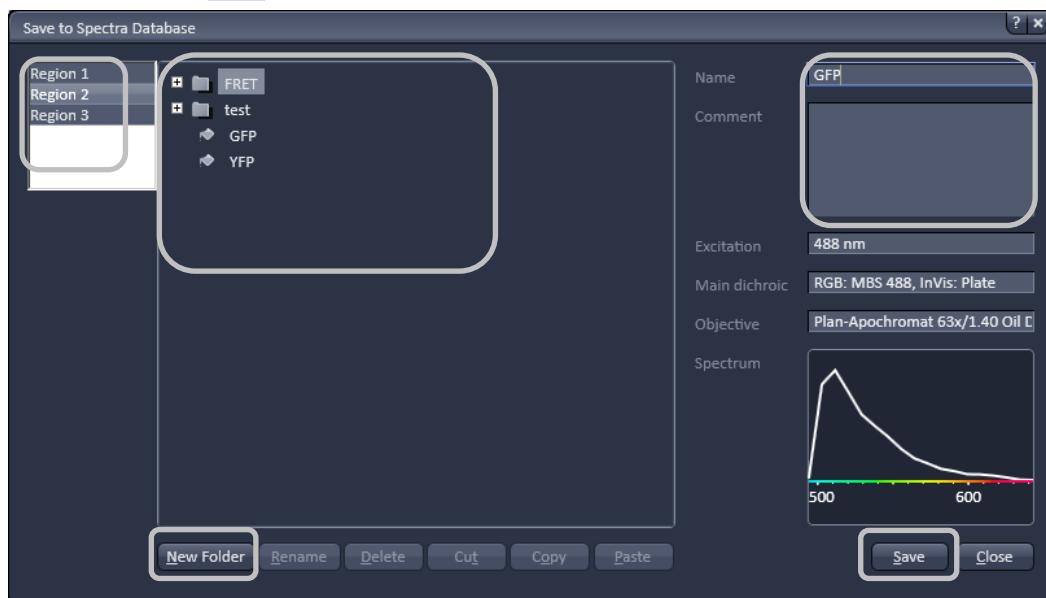
1-5-2. 多重染色の染め分け部分が特定しにくい場合(Case 2)

(1) リファレンスとなるスペクトルを表示させ、そのスペクトル情報をデータベースに保存します。

- ・ 測定ツール内にある **Save to spectra database...** ボタンをクリックします。

新規フォルダを作成し、スペクトルデータを保存します。

- ① **New Folder** ボタンをクリックすると、フォルダ名を入力するためのウィンドウが表示されますので、名前を入力し **OK** をクリックします。
- ② データベース一覧の中に作成したフォルダが表示されますので選択します。
- ③ 保存したいスペクトルデータに対応する **Region No.** を選択します。
- ④ **Name** の欄に色素名等分かりやすい名称を入力します。必要があれば、**Comment** 欄に任意の必要事項を入力します (Comment は後から入力することも可能です)。
- ⑤ 最後に **Save** をクリックします。



保存されているスペクトルデータは、**File - Spectra Database...** から確認をすることができます。

(2) 保存されているリファレンス スペクトルデータから**Linear Unmixing**処理を行います。

- ① メインタブの**Processing**を開きます。
- ② **Linear Unmixing**を選択します。
- ③ 分離を行いたい画像を表示し、**Select**をクリックして画像を選択します。
- ④ **Components**より分離をしたい蛍光の数を選択します。
- ⑤ 擬似カラーで表示されたボタンをクリックすると、スペクトルデータベースが開きますので、ここから分離したい蛍光のリファレンスデータを選択し、チェックを入れます。また、分離後の蛍光の擬似カラーをリストより選択します。
- ⑥ Unmixing後の画像がプレビュー表示されます。



- ⑦ 必要に応じて**Auto scale**(自動明るさ調整)や**Display Channel with Residuals**(残差表示)にチェックを入れます。また、必要に応じて**Background**より既に選択してあるリファレンスを選択し、バックグラウンドデータとして設定します (Unmixingの際には、バックグラウンドを引いた結果を表示します)。
- ⑧ **Apply**をクリックするとUnmixingされた画像が新規に作成されます。

2. Online Fingerprinting

スキャンしながら Online で Emission Fingerprinting と Linear Unmixing を行うモードです。ダイレクトに分離結果の画像を表示していくため、大容量のデータを取得する事が考えられる λ -3D、 λ -Time、 λ -3D+Time の際には、メモリの負担を軽減しつつ画像取得を行う事が出来ます。

このモードを使用する際には、あらかじめリファレンスの蛍光スペクトルを取得しておいて下さい。

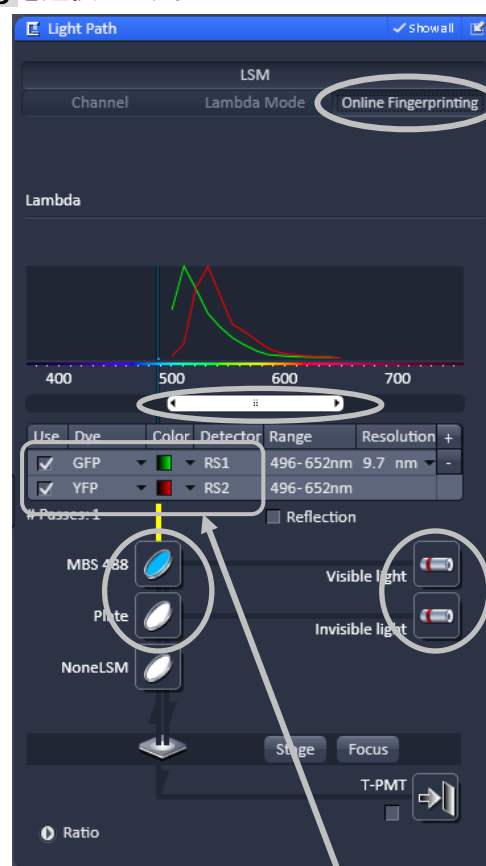
2-1. 光路の設定

Light Path ツールより **Online Fingerprinting** を選択します。

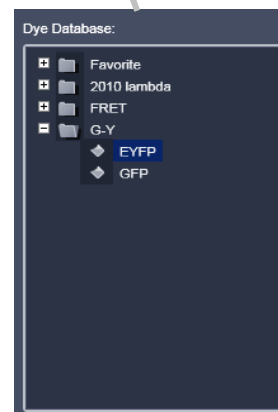
Light Path ツールより、**リファレンスデータを取得した時と同じ光路に設定します。**

検出波長範囲は、リファレンスデータの波長範囲より広く設定して使用することはできません。

- ① **Laser**: 励起レーザ波長の選択と強度の調整を行います。
- ② **MBS**: 使用するレーザに合ったビームスプリッタを選択します。
- ③ **検出波長範囲**: どの程度の波長範囲を取得するかを選択します。
- ④ **Dye**リストのプルダウンをクリックすると、スペクトルデータベースが開きますので、ここから分離したい蛍光のリファレンスデータを選択し、チェックを入れます。また、分離後の蛍光の擬似カラーをリストより選択します。



光路及び、リファレンスデータの設定をすると、呼び出したスペクトルカーブが **Light Path** に表示されます。



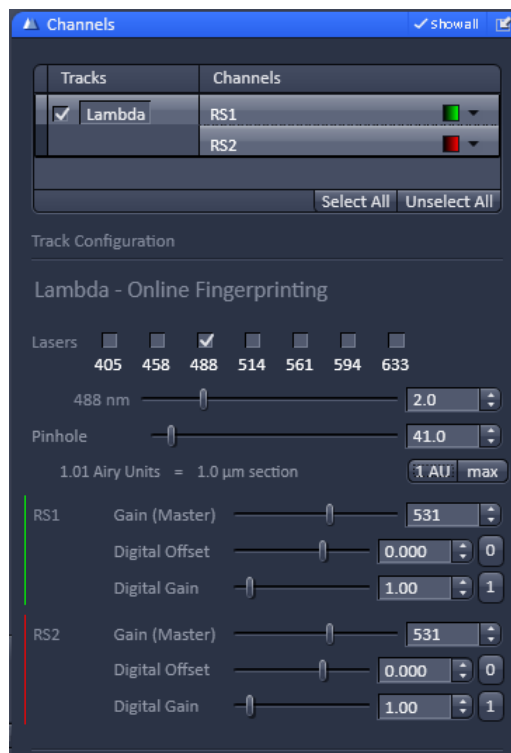
2-2. 画質の調整、画像の取得

・Gain(Master) , Digital Offset, Digital Gain やレーザ強度の調整をします。

Gain(Master)は、全チャンネルで共通になります。
チャンネルごとに明るさの調整を行う場合は、
Digital Gain, Digital Offset を使用します。

スキャンをすると、前頁で呼び出したリファレンス
スペクトルを元に Linear Unmixing 処理をした画像
が表示されます。

注) Online Fingerprinting では、Unmixing 処理後の
画像のみ表示されます。λ スタックデータは残りま
せんのでご注意ください。詳細なスペクトルデータが
必要な場合は、Lambda mode を使用してください。

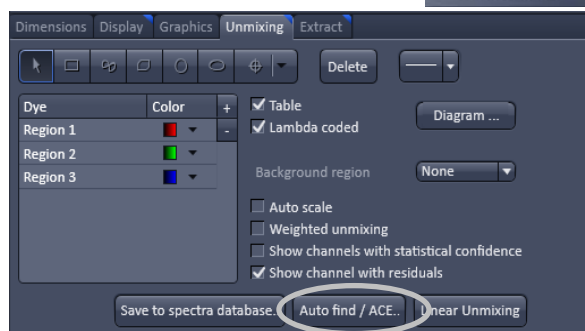


3. その他の機能

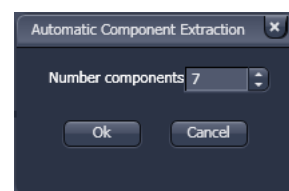
3-1. ACE (Automatic Component Extraction)

画像の中に含まれるスペクトルを自動で検出する機能です。

- ① **Lambda Mode** で画像を取得し、**Unmixing** タブを開いて、**Unmixing コントローラ**を表示させます。
- ② 測定ツール内の **Auto find / ACE** をクリックします。
- ③ 画像中に含まれる蛍光色素の数を入力し、**OK** をクリックします。
- ④ 画像上に自動的に認識された多点を表示し、そのスペクトルが左側に表示されます。



※ **ACE** で検出されたスペクトルをリファレンスとして Unmixing を行う場合、ここで正確なスペクトルが得られているかどうかを確認してください。

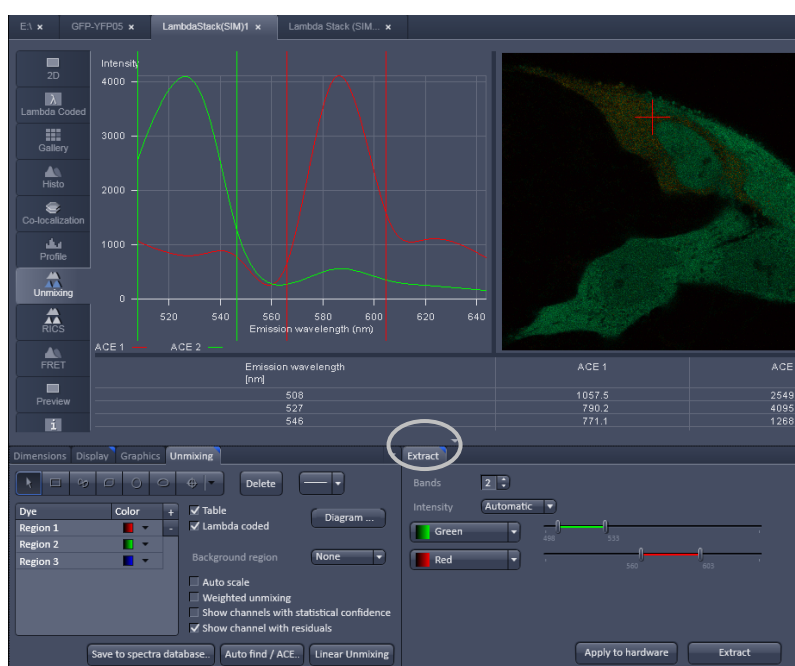


注意) **ACE** では指定した数だけ、スペクトルの計測を自動的に行います。既知のサンプルに対しては有効な機能となりますが、色素の共存の有無がハッキリしない、蛍光輝度の差が大きい場合には、リファレンスに適さないスペクトルを検出してしまう場合があります。そのような場合は **ACE** を使用せず、1 色ずつ染色したリファレンスサンプルを作製し、正確なスペクトルの計測を行う事をお勧めします。

3-2. Extract

λスタックから、特定の波長帯の情報のみを抽出した画像を作成することができます。

- ① **Lambda Mode**で画像を取得し、**Unmixing**タブを開いて、**Extract**コントロールを表示させます。
- ② **Bands**にて、チャンネル数を設定します。
- ③ 設定したチャンネル数のスライダーが表示されますので、任意の波長帯域を選択します。スペクトルグラフ上に、選択した範囲を示す縦軸が表示されますので、グラフ上からも波長範囲の設定が可能です。
- ④ **Intensity**にて、**Mean**(平均)、**Sum**(加算)、**Automatic**(自動的に同じくらいの明るさになるよう調整)を選択し、**Extract** をクリックすると、選択した範囲のチャンネル情報を抽出し、新規画像を作成します。



3-3. Apply to hardware

測定した蛍光スペクトルから、任意の波長帯(バンドパス)を設定し、**Channel mode**に反映させることができます。スペクトルのピーク波長を確認しながら、あるいは自家蛍光などの取得したくない波長帯を除いてバンドパスの設定をすることが可能です。

- ① 上記 3-2①～③同様に、**Extract** コントローラから波長帯を選択します。
- ② **Apply to hardware** をクリックすると、選択した波長帯を検出するバンドパスの設定として **Channel Mode** に反映されます。

